

ШАМСУТДИНОВ ТАЛГАТ РАХИМЗЯНОВИЧ

**ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗА *BACILLUS INTERMEDIUS*,
СЕКРЕТИРУЕМАЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS
SUBTILIS* НА РАЗНЫХ ФАЗАХ РОСТА**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2009

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, старший
научный сотрудник, г. Казань
Коксин Владимир Петрович

Доктор ветеринарных наук, профессор,
г. Казань
Алимов Азат Миргасимович

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики
КНЦ РАН, г. Казань

Защита диссертации состоится «26» марта 2009 г. в часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан «24» февраля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

З.И. Абрамова

Актуальность проблемы. Интерес к микробным ферментам и, в частности, к протеиназам бацилл, объясняется недостаточной способностью протеолитических белков животного и растительного происхождения удовлетворять спрос на жизненные потребности населения планеты. Микроорганизмы являются источником всех типов гидролаз благодаря широкому разнообразию, простоте культивирования, безопасности в работе, способности к генетическим преобразованиям. Использование ферментов имеет ряд преимуществ по сравнению с химическими веществами. Протеолитические белки микроорганизмов высокоактивны, доступны и легко биodeградируются. В последние годы наблюдается интенсивное развитие биотехнологического производства бактериальных ферментов, область применения которых – промышленность, медицина, научные исследования.

Одной из наиболее интересных групп класса протеолитических ферментов являются сериновые протеиназы бацилл. Эти белки участвуют в адаптационных процессах в условиях стресса, спорообразовании и прорастании спор. Неослабевающий интерес к этим белкам обусловлен широтой их практического применения. Выход целевого продукта у бацилл может быть существенно повышен за счет направленного воздействия на условия роста, использования штаммов с нарушениями систем регуляции, либо модификацией гена. На основе протеиназ бацилл конструируют каталитические антитела с протеолитической активностью. Выделены протеиназы бацилл, обладающие фибринолитическими и тромболитическими свойствами. В связи с ростом числа заболеваний, связанных с тромбообразованием, актуальным является поиск новых ферментов с высокой активностью, специфичностью и низкой токсичностью. Одной из подгрупп сериновых протеиназ являются глутамилэндопептидазы, обладающие узкой субстратной специфичностью. Поэтому они являются высокоточными "инструментами" для фрагментации белковых молекул при исследовании первичной структуры.

Поскольку бациллы секретируют различные протеиназы, выделение индивидуальных белков контаминирует с белковыми примесями, которые затрудняют аналитические исследования фермента. Генно-инженерные методы позволяют создавать рекомбинантные штаммы, содержащие на плазмиде ген индивидуального белка, что перспективно для разработки способов получения гомогенных протеиназ.

Целью работы явилось выделение, очистка и сравнительная характеристика глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом на разных фазах роста.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Подбор условий культивирования для выделения глутамилэндопептидазы *B. intermedius* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* на разных стадиях роста.

2. Выделение и очистка глутамилэндопептидазы *B. intermedius* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма на разных стадиях роста.

3. MALDI-TOF анализ аминокислотных последовательностей глутамилэндопептидазы, соответствующей разным стадиям роста.

4. Сравнительное исследование свойств глутамилэндопептидазы разных фаз роста.

5. Выяснение роли дисульфидной связи в образовании конформеров глутамилэндопептидазы.

Научная новизна. Впервые выделена и охарактеризована глутамилэндопептидаза *B. intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на разных стадиях роста. Впервые проведена сравнительная характеристика свойств ранней и поздней глутамилэндопептидазы. Получены приоритетные данные, о различие их каталитических характеристик (K_m и k_{cat}). Установлено, что оба препарата идентичны по первичной структуре, их N- и C-концевые аминокислотные остатки совпадают. Впервые получены данные о содержании в структуре позднего фермента восстановленной дисульфидной связи в отличие от ранней глутамилэндопептидазы. Сравнительные исследования позволили заключить, что статус дисульфидной связи может определять степень молекулярной активности глутамилэндопептидазы разных фаз роста.

Практическая значимость. Подобраны условия культивирования бактерий для эффективной продукции глутамилэндопептидазы *B. intermedius* на разных стадиях роста для проведения эффективной очистки фермента. Полученный в работе рекомбинантный штамм *B. subtilis* может быть использован как эффективный продуцент глутамилэндопептидазы. Результаты работы могут быть использованы при разработке стратегии синтеза ферментов промышленными штаммами бактерий. Получение гомогенных препаратов ферментов увеличивает арсенал белков, используемых в научных исследованиях и в практических целях. Результаты исследования свойств раннего и позднего фермента рекомбинантного штамма *B. subtilis* позволят расширить наши представления о сериновых протеиназах, в частности, об особой подгруппе ферментов – глутамилэндопептидазах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования: Работа выполнялась в соответствии с планом НИР КГУ (№ гос. регистрации 01.02.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования поддержаны грантами РФФИ 05-04-48182-а, Академии наук РТ № 03-3.5-20 и Аналитической Ведомственной Целевой Федеральной Программы РНП 2.11.1005. Авторские исследования получили персональную поддержку Правительства Республики Татарстан (2007 г) и были удостоены именной стипендии президента Республики Татарстан.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны условия культивирования и получена глутамилэндопептидаза *B. intermedius*, соответствующая разным фазам роста рекомбинантного штамма.

2. Глутамилэндопептидаза, разных фаз роста характеризуется идентичной аминокислотной последовательностью, но отличается по каталитическим характеристикам и энзиматическим свойствам.

3. Дестабилизация глутамилэндопептидазы стадии позднего стационара по сравнению с соответствующим ферментом фазы замедления роста связана со статусом дисульфидной связи в белковой глобуле.

Апробация работы: Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных, всероссийских и региональных конференциях: "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2005, 2006, 2007), школах-конференциях молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пущино, 2005, 2006), Всероссийской научной конференции "Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение" (Казань, 2005), V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука. Инновации. Бизнес» (Казань, 2005), Международной конференции аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», (Москва, 2005, 2006), Материалах XLIII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» секция биология (Новосибирск, 2005), VI симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2007), Материалах докладов съезда с международным участием «IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов» (Новосибирск, 2008), Материалах XLVI международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2008).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 21 научных работ.

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц, 24 рисунка. Библиография содержит 100 наименований российских и зарубежных авторов.

Благодарности: Автор выражает глубокую признательность научному руководителю проф. М.Р. Шариповой за внимательное отношение к работе; д.х.н., проф. Г.Н. Руденской за возможность проведения экспериментов на базе лаборатории кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ; к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан, к.б.н., доц. А.М. Мардановой и к.б.н., доц. В.И. Вершининой за постоянную помощь в проведении экспериментов и обсуждении результатов; проф. С.В. Кострову (ИМГ РАН); к.б.н., с.н.с. И.В. Демидюку (ИМГ РАН) за предоставление плазмиды Δ58.21 и антисыворотки к глутамилэндопептидазе; проф. Е. Феррари (Genencor Int. Inc., США) за предоставление протеазо-дефицитного штамма *B. subtilis*. Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского университета проф. О.Н. Ильинской и сотрудникам кафедры микробиологии за помощь и теплую рабочую атмосферу.

Материалы и методы

Штаммы и плазмиды. В работе использовали мультикопийную плазмиду Δ58.21, полученную на основе вектора pCB22 [Rebrikov et al., 1999] и любезно предоставленную для работы проф. Костровым С.В. (ИМГ РАН). Плазида Δ58.21 содержала вставку размером 2.6 т.п.о. с геном глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 под контролем собственных регуляторных элементов.

В качестве штамма-реципиента для плазмиды с геном глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 использовали штамм *B. subtilis* JB 20-36 (Δap^r, Δnp^r), из хромосомной ДНК которого делетированы гены внеклеточных протеиназ (проф. Е. Феррари, Genencor Int. Inc., США).

Культивирование бактерий. Исходной питательной средой для культивирования рекомбинантных бактерий являлась пептон-содержащая среда [Частухина с соавт., 2005]. Для подбора оптимальной среды использовали гидролизат коллагена (коллагин) («Биопрогресс», Россия) в концентрации 1% и 2% в качестве добавки к пептон-содержащей среде. Кроме того, производили замену пептона «Sigma» на ферментативный пептон «Диа-М» в концентрациях 10-30 г/л. В среду культивирования непосредственно перед посевом добавляли хлорамфеникол в концентрации 20 мкг/мл. Растворы неорганического фосфата (Na₂HPO₄) стерилизовали при 1 атм. и вносили в среду перед посевом в концентрациях 0,1-0,4 г/л.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на ФЭК-56М при 590 нм. Протеолитическую активность определяли по гидролизу синтетического хромогенного субстрата Z-Glu-pNA [Люблинская с соавт., 1987] и казеина [Каверзнева, 1971]. Удельную активность выражали в ед/мг белка.

Выделение и очистку глутамилэндопептидазы разных фаз роста из культуральной жидкости проводили методом ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и колонке MonoS в системе FPLC («Pharmacia», Швеция).

Степень чистоты белковых препаратов и молекулярную массу определяли электрофорезом в денатурирующих условиях по методу Лаэммли [Laemmli, 1970] и в нативных условиях в 10% ПААГ, как описано на сайте (http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/PAGE_Acidic.html).

Гомогенные препараты белка, секретируемые на разных фазах роста культуры, анализировали с помощью метода масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Полученные данные обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint (<http://www.matrixscience.com>) и Peptide Mass (<http://cn.expasy.org>).

Иммуноферментный анализ проводили на кроличьих антителах к глутамилэндопептидазе *B. intermedius* 3-19. Кроличья антисыворотка к внеклеточной глутамилэндопептидазе *B. intermedius* любезно предоставлена для работы проф. Костровым С.В. (ИМГ РАН).

Субстратную специфичность глутамилэндопептидазы определяли, как описано в работе [Люблинская с соавт., 1987], на следующих синтетических тетрапептидах: Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Trp-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNa, Z-Gly-Ala-Ala-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Met-Asp-

pNa, Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNa, а также Z-Glu-pNa. Специфичность глутамилэндопептидазы по отношению к природным субстратам определяли по гидролизу В – цепи окисленного инсулина, как описано в работе [Leshchinskaya et al., 1997].

Влияние ингибиторов на активность фермента определяли, используя диизопропилфторфосфат (DFP), фенилметилсульфонилфторид (PMSF), динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), офенантролин, бензамидин и имидазол (“Sigma”, Германия) в молярном соотношении фермент: ингибитор=1:100. Белковые ингибиторы: утиный овомукоид и соевый ингибитор трипсина (“Sigma”, Германия) использовали в молярном соотношении 1:10.

Свойства ферментов. K_m и k_{cat} препаратов протеиназ определяли по гидролизу специфического хромогенного субстрата Z-Glu-pNa с использованием двухлучевого спектрофотометра Lambda 35 «Perkin Elmer» (США).

pH- и T-оптимум, pH- и T-стабильность протеиназ исследовали по гидролизу синтетического хромогенного субстрата Z-Glu-pNA с использованием 0,1М трис-HCl буфера с pH от 7,2 до 10,0 с ионами Ca^{2+} в конечной концентрации 5 мМ.

Изучение влияния ионов 2-х валентных металлов на активность фермента проводили с использованием солей $MgSO_4$, $CaCl_2$, $MnSO_4$, $CoCl_2$. К раствору белка добавляли раствор соответствующей соли до конечных концентраций (1; 2.5; 5; 10 и 20 мМ) и выдерживали в течение 10 мин. В качестве контроля (100%) принимали активность фермента без ионов металлов.

Математическую обработку полученных данных проводили в программной среде «Microsoft Excel». Результаты многофакторных экспериментов обрабатывали с помощью программы STATGRAPHICS.

Результаты исследований и их обсуждение

Динамика роста и накопления глутамилэндопептидазы *B. intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. После трансформации плазмиды Δ58.21, несущей ген глутамилэндопептидазы *B. intermedius* под собственным промотором, в протеазо-дефицитный лабораторный штамм *B. subtilis* JB 20-36 изучали экспрессию гена в рекомбинантном штамме. Выбор штамма-реципиента определялся отсутствием у него протеолитической активности в культуральной жидкости, что позволяет получить модельный штамм для изучения экспрессии индивидуального гена и корректно провести выделение и очистку соответствующего белка на разных фазах культивирования.

При исследовании динамики накопления внеклеточной глутамилэндопептидазы нами обнаружены два максимума накопления протеолитической активности по расщеплению специфического хромогенного субстрата Z-Glu-pNA: в фазе замедления роста (24 ч) (ранний фермент) и в поздней стационарной фазе роста (48 ч) (поздний фермент)

(рисунок 1). При этом уровень накопления раннего фермента в 1,5 раза превышал таковой в поздней стационарной фазе роста культуры. Удельная скорость накопления ранней глутамилэндопептидазы (ϵ , ед.акт. \times ч $^{-1}$) в культуральной жидкости возрастала в период, когда удельная скорость роста культуры падала (μ , ед.акт. \times ч $^{-1}$), т.е. согласно модели Колемана эта протеиназа может быть охарактеризована как катаболитный фермент [Coleman et al., 1975].

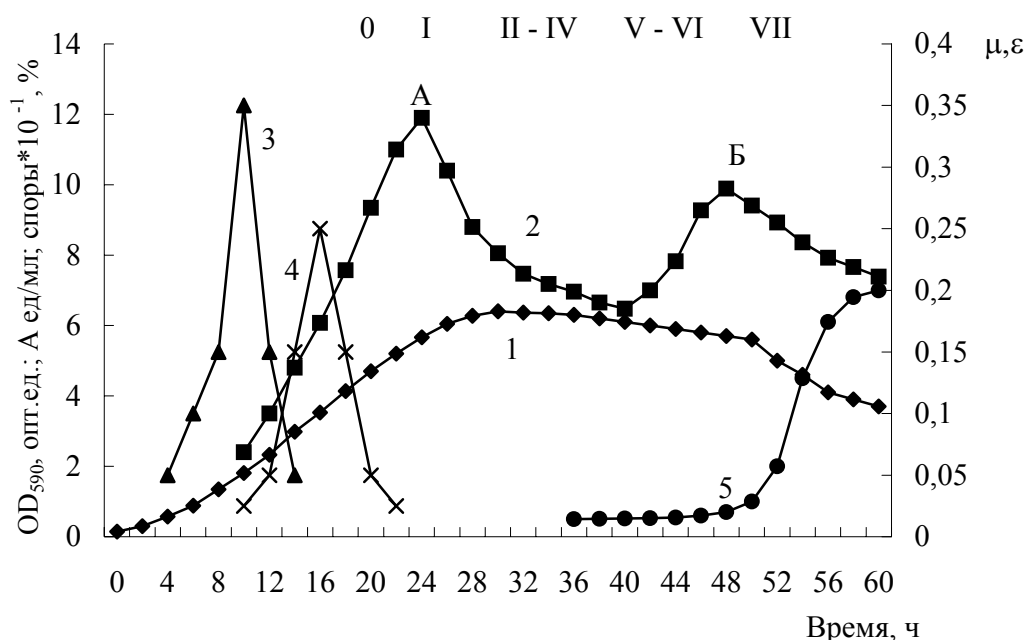


Рисунок 1 — Динамика роста, спорообразования и накопления глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

А — ранняя глутамилэндопептидаза; Б — поздняя глутамилэндопептидаза

1 — рост культуры, OD₅₉₀

2 — активность глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B. subtilis*. (ед/мл)

3 — удельная скорость роста (μ , ед.акт. \times ч $^{-1}$)

4 — удельная скорость накопления глутамилэндопептидазы (ϵ , ед.акт. \times ч $^{-1}$)

5 — количество свободных спор, %

Полученные данные свидетельствуют, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы у рекомбинантного штамма характеризуется двумя максимумами активности фермента, что взаимосвязано с физиологическим циклом бацилл.

Подбор питательной среды. Для выделения и очистки внеклеточной глутамилэндопептидазы разных фаз роста бактерий, проводили подбор компонентов питательной среды для эффективной продукции фермента на соответствующие часы роста микроорганизмов. Варьировали концентрации основных источников азота — пептона и триптона в составе среды культивирования. Наряду с этими источниками питания использовали гидролизат коллагена (коллагин) в качестве более доступной замены пептона и триптона в условиях масштабирования процесса очистки белка. Как видно из таблицы 1, максимальный уровень активности глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости наблюдался в опытах с пептон-содержащей средой

и средой LB без внесения дополнительных компонентов и замен одного источника азота на другой: пептона и триптона - на гидролизат коллагена (коллагин), бактериологического пептона - на ферментативный пептон.

Таблица 1

Подбор питательной среды для максимальной продукции глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на разных фазах роста

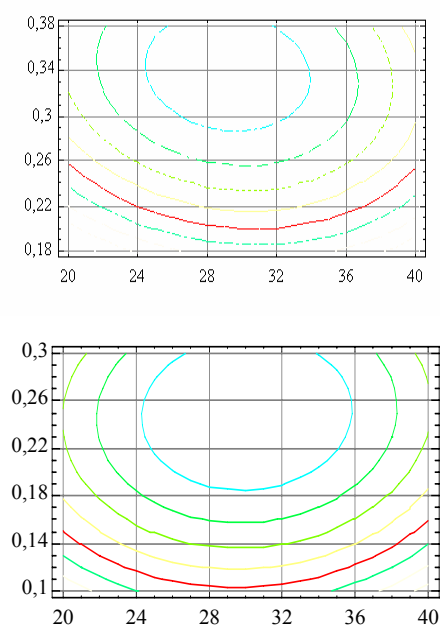
Состав питательной среды	Активность, ед/мг	
	В фазе замедления роста	В стационарной фазе
LB	1,12	0,5
LB+1% коллагин	0,33	0,2
LB+2% коллагин	0,25	0,15
LB (триптон→1% коллагин)	0,6	0,22
LB (триптон→2% коллагин)	0,7	0,38
Пептон-содержащая среда (бактериологический пептон, 20 г/л)	1,33	0,58
Пептон-содержащая среда+1% коллагин	0,55	0,21
Пептон-содержащая среда+2% коллагин	0,33	0,18
Пептон-содержащая среда (пептон→1% коллагин)	0,63	0,29
Пептон-содержащая среда (пептон→2% коллагин)	0,6	0,31
Пептон-содержащая среда (ферментативный пептон, 20 г/л)	0,65	0,4
Пептон-содержащая среда (ферментативный пептон, 30 г/л)	0,75	0,43
Пептон-содержащая среда (ферментативный пептон, 40 г/л)	0,71	0,41

Активность фермента в пептон-содержащей среде составила для ранней глутамилэндопептидазы – 1,33 ед/мг, для поздней – 0,58 ед/мг, в среде LB – 1,12 и 0,5 ед/мг соответственно. Замена пептона на гидролизат коллагена (коллагин), а также внесение последнего в качестве дополнительного источника питания снижали активность протеиназы более, чем в 2 раза (0,6 – 0,55 ед/мг – для ранней протеиназы, 0,31 – 0,21 ед/мг – для поздней протеиназы). Использование ферментативного пептона в концентрациях 10 – 30 г/л вместо бактериологического пептона приводило к снижению активности глутамилэндопептидазы, но в меньшей степени, чем при использовании гидролизата коллагена (коллагина) (0,65 – 0,71 ед/мг – для ранней протеиназы, 0,4 – 0,41 ед/мг – для поздней протеиназы). Таким образом, применение гидролизата коллагена (коллагина) и ферментативного пептона в составе питательной среды нецелесообразно. Поэтому для очистки

глутамилэндопептидазы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма использовали среду LB и пептон-содержащую среду.

Исследовали влияние соотношения двух основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата на биосинтез ранней и поздней глутамилэндопептидазы в двухфакторных экспериментах. Оптимальное соотношение концентраций двух основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата для эффективной продукции фермента на разных фазах роста культуры подбирали в многофакторных экспериментах с последующей обработкой результатов в программе STATGRAFICS. Результаты двухфакторных экспериментов представлены на рисунке 2 в виде линий уровня активности глутамилэндопептидазы, где выделяется оптимальная по двум рассматриваемым факторам зона.

Итак, максимальные значения по активности глутамилэндопептидазы, секретируемой рекомбинантным штаммом на 24-й час культивирования наблюдаются при концентрации в среде пептона 30,5 г/л и неорганического фосфата 0,34 г/л, на 48-й час культивирования - при концентрации в среде пептона 30 г/л и неорганического фосфата 0,25 г/л.



Таким образом, подобрано оптимальное соотношение в среде концентраций пептона и неорганического фосфата для получения глутамилэндопептидазы на разных стадиях роста бацилл.

Очистка глутамилэндопептидазы разных фаз роста. Глутамилэндопептидазу *B. intermedius* выделяли из культуральной жидкости на разных фазах роста бактерий: на 24 и 48 ч и подвергали процедуре очистки (таблица 2). Выделение фермента из освобожденной от клеток культуральной жидкости проводили с помощью ионообменной хроматографии на КМ –

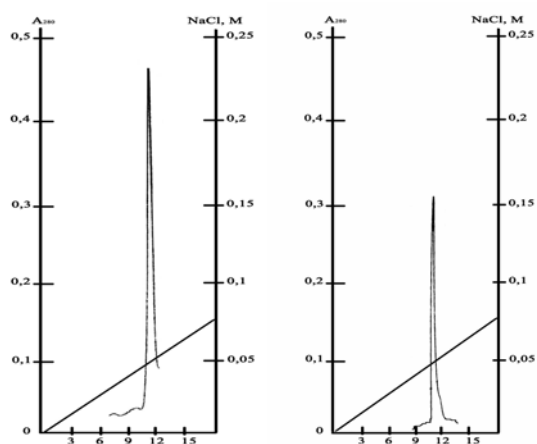
целлюлозе. Это позволило за одну стадию очистки получить глутамилэндопептидазу со степенью очистки в 250-300 раз с выходом 31 и 38,8%, для раннего и позднего фермента соответственно. Последующую очистку проводили на колонке Mono S в системе FPLC-хроматографии. Ранняя глутамилэндопептидаза получена со степенью очистки 1257 и выходом 12,5%. Степень очистки поздней глутамилэндопептидазы составила 1350 с выходом фермента 7,8%.

Таблица 2

**Очистка глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, секретируемой
рекомбинантным штаммом *B. subtilis***

Стадии очистки	V, мл	Белок общ., ед.	Активность общ., ед. акт.	Уд. акт. ед. акт./A ₂₈₀	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость						
Ранняя протеиназа	1850	33300	46.3	0.0014	1	100
Поздняя протеиназа	1900	43700	41.8	0.001	1	100
Хроматография на КМ-целлюлозе						
Ранняя протеиназа	44	42.5	18.0	0.42	300	38.8
Поздняя протеиназа	46	50.6	12.9	0.25	250	31.0
Хроматография на колонке MonoS						
Ранняя протеиназа	15	3.3	5.8	1.76	1257	12.5
Поздняя протеиназа	12	2.4	3.25	1.35	1350	7.8

Хроматографические профили ранней и поздней глутамилэндопептидазы *B. intermedius* рекомбинантного штамма представлены на рисунке 3.



Чистота очищенного фермента исследована с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рисунок 4). Ранняя и поздняя глутамилэндопептидазы представлены одной белковой полосой, подтверждающей гомогенность белка.

Проводили иммунологический анализ глутамилэндопептидазы с использованием кроличьей антисыворотки против гомогенной глутамилэндопептидазы, полученной из культуральной жидкости *B. intermedius* 3-19. Методом иммунодиффузии для фермента разных фаз роста показано образование преципитатов против лунки, содержащей антисыворотку к глутамилэндопептидазе исходного штамма *B. intermedius* (рисунок 5). Полученные результаты указывают на идентичность глутамилэндопептидазы, продуцируемой рекомбинантными клетками *B. subtilis*, ферменту, синтезируемому исходным штаммом *B. intermedius*. Вместе с тем, данные экспериментов свидетельствуют об идентичности аминокислотной последовательности глутамилэндопептидазы, соответствующей разным стадиям роста.

Препараты протеиназы, 24 и 48 ч роста бактерий анализировали методом MALDI-TOF - масс-спектрометрии, который позволил установить первичную структуру аминокислотной последовательности и молекулярную массу исследуемого белка (рисунок 6).

Глутамилэндопептидаза разных фаз роста по результатам MALDI-TOF имеет молекулярную массу 22,7 кДа, что совпадает с данными, полученными методом SDS-электрофореза.

```

1 VVIGDDGRTKVANTRVAPYNSIAYITFGGSSCTGTLIAPNKILTNGH
1 VVIGDDGRTKVANTRVAPYNSIAYITFGGSSCTGTLIAPNKILTNGH

48 CVYNTASRSYSAKGSVYPGMNDSTAVNGSANMTEFYVPSGYINTGAS
48 CVYNTASRSYSAKGSVYPGMNDSTAVNGSANMTEFYVPSGYINTGAS

95 QYDFAVIKTDNTNIGNTVGYRSIRQVTNLTGTTIKISGYPGDKMRSTG
95 QYDFAVIKTDNTNIGNTVGYRSIRQVTNLTGTTIKISGYPGDKMRSTG

142 KVSQWEMSGSVTREDTNLAYYTIDTFSGNSGSAMLDQNQQIVGVHNA
142 KVSQWEMSGSVTREDTNLAYYTIDTFSGNSGSAMLDQNQQIVGVHNA

189 GYSNGTINGGPKATAAFVEFINYAKAQ 215 -- Ранний белок
189 GYSNGTINGGPKATAAFVEFINYAKAQ 215 -- Поздний белок

```

Рисунок 6 – Аминокислотная последовательность глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на разных фазах роста, полученная с помощью MALDI-TOF анализа.

Электрофорез в неденатурирующих условиях показал наличие одной полосы для обоих препаратов, а значит фермент, соответствующий разным стадиям роста, представляет собой мономерный белок (рисунок 7).



Сравнительная характеристика глутамилэндопептидазы разных фаз роста. Исследовали действие ингибиторов различной природы на активность глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на разных стадиях роста.

Согласно полученным данным, ранняя и поздняя глутамилэндопептидаза не чувствительна к действию ингибиторов

металлопротеиназ: ЭДТА и о-фенантролина. Активность фермента полностью подавлялась специфическим ингибитором сериновых протеиназ – диизопропилфторфосфатом (DFP). Полное подавление со стороны специфического ингибитора сериновых протеиназ указывает на принадлежность белка к этому классу ферментов.

Фенилметилсульфонилфторид (PMSF) частично ингибировал активность протеиназы, причем, активность позднего фермента ингибировалась на 35%, а фермента, соответствующего вегетативному росту только на 15% (таблица 3). Имидазол, бензамидин и белковые ингибиторы снижают активность позднего фермента, в то время как на активность раннего фермента не влияют. Полученные данные могут свидетельствовать о различии конформационного статуса белка разных фаз роста.

Таблица 3

**Влияние ингибиторов на активность препаратов глутамилэндопептидазы
*B. intermedius***

Ингибиторы	Мол. соотн. фермент: ингибитор	Субстрат Z-Glu-pNA	
		Остаточная активность, %	
		Ранняя глутамилэндопептидаза	Поздняя глутамилэндопептидаза
DFP	1:100	0	0
PMSF	1:100	85	65
ЭДТА	1:100	100	100
о-фенантролин	1:100	100	100
Имидазол	1:100	100	75
Бензамидин	1:100	100	60
Соевый ингибитор трипсина	1:10	100	85
Овомукоид утиный	1:10	100	70

* σ - $\approx 10\%$

Изучение субстратной специфичности глутамилэндопептидазы, выделенной на разных фазах роста рекомбинантного штамма, проводили по гидролизу различных синтетических пептидных и белковых субстратов (таблица 4).

Активность обоих препаратов по отношению к синтетическим пептидам, содержащим остаток глутаминовой кислоты выше, чем на субстратах, содержащих остаток аспарагиновой кислоты, что характерно для ферментов этой группы. Полученные данные позволили достоверно установить, что препарат ранней глутамилэндопептидазы характеризуется более высокой скоростью расщепления синтетических субстратов по сравнению с поздним ферментом. Удельная активность раннего белка на

синтетических пептидах в 3-5 раз выше, чем позднего. Та же закономерность сохраняется при расщеплении белковых субстратов, активность по расщеплению которых в 2-5 раз выше для раннего фермента.

Специфичность обоих препаратов фермента исследовали по расщеплению окисленной В-цепи инсулина (рисунок 8).

Таблица 4

Субстратная специфичность глутамилэндопептидазы разных фаз роста по гидролизу синтетических и белковых субстратов

Субстрат	Удельная активность, ед/мг	
	ранний фермент	поздний фермент
Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNA	188	55,6
Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNA	179	63,2
Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNA	162	31,6
Z-Gly-Ala-Ala-Glu-pNA	52,5	15
Z-Ala-Ala-Trp-Glu-pNA	39	8,8
Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNA	10,4	2,5
Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNA	7	2
Z-Ala-Ala-Met-Asp-pNa	4,7	1,1
Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNA	1,9	0,4
Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNA	0,9	0,2
Азоальбумин	11,3	8
Азоказеин	10,1	2,9
Казеин	9,9	2,1

F-V-N-Q-H-L-C-G-S-H-L-V-E-A-L-Y-L-V-C-G-E-R-G-F-F-Y-T-P-K-A

Рисунок 8 – Гидролиз В-цепи инсулина глутамилэндопептидазой *B. intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на разных фазах роста.

Полученные данные показали, что ранняя протеиназа гидролизует окисленную В-цепь инсулина по остатку глутаминовой кислоты и двум остаткам цистеиновой кислоты. А поздняя протеиназа гидролизует В-цепь инсулина только по остатку глутаминовой кислоты. Таким образом, препараты глутамилэндопептидазы различаются по степени гидролиза окисленной В-цепи инсулина.

Константы Михаэлиса для протеиназы, разных стадий роста определяли по гидролизу специфического хромогенного субстрата. Из графика, построенного в координатах Лайнуивера–Берка, следует, что K_m для ранней

протеиназы составила 4,3 мМ, а для поздней – 8,8 мМ. Каталитическая константа k_{cat} (1437с^{-1}) раннего белка выше, чем позднего (887с^{-1}), что указывает на более эффективное расщепление субстрата, по сравнению с поздним ферментом.

Таким образом, каталитические константы и результаты определения субстратной специфичности позволяют сделать вывод о более высокой удельной активности и скорости гидролиза субстратов для ранней глутамилэндопептидазы.

Исследовали зависимость активности глутамилэндопептидазы разных стадий роста от температуры в отсутствие и присутствии 5 мМ ионов Ca^{2+} (рисунок 9). Ранняя глутамилэндопептидаза проявляет максимальную активность при 45°C в отсутствие ионов Ca^{2+} , активность резко снижается при $50-55^\circ\text{C}$. Присутствие ионов Ca^{2+} в реакционной смеси сдвигает оптимум температуры на 15°C и увеличивает активность на 20%.

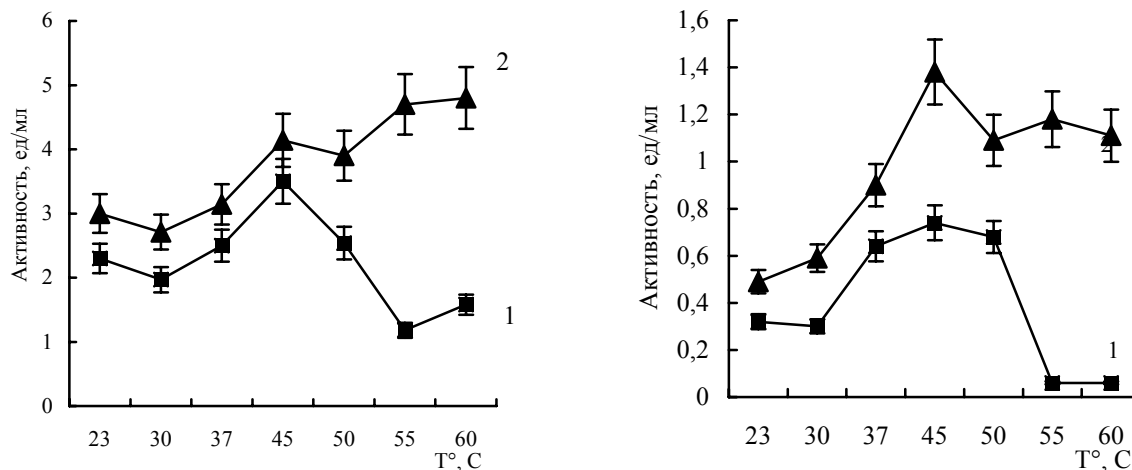


Рисунок 9 – Температурный оптимум препаратов глутамилэндопептидазы *B. intermedius*:

А-ранняя глутамилэндопептидаза; Б-поздняя глутамилэндопептидаза

1-активность в отсутствие ионов Ca^{2+} ; 2-активность в присутствии ионов Ca^{2+}

Максимальная активность поздней глутамилэндопептидазы в отсутствие ионов Ca^{2+} наблюдается в диапазоне температур от 37 до 50°C , при 55°C фермент теряет активность. В присутствии ионов Ca^{2+} фермент проявляет максимальную активность при 45°C , причем активность увеличивается почти в 2 раза по сравнению с таковой без ионов Ca^{2+} . При исследовании термостабильности установлено, что термостабильность раннего фермента превышает на $5-8^\circ$ термостабильность позднего белка и увеличивается в присутствии Ca^{2+} .

Препараты ранней и поздней глутамилэндопептидазы стабильны в диапазоне pH $7,5-9,5$, причем ранний фермент проявляет более высокую pH-стабильность по сравнению с поздним белком: его активность начинает снижаться при pH выше 9,5, тогда как активность позднего фермента снижается при pH 9,0.

Известно, что ионы двухвалентных металлов стабилизируют молекулу фермента и необходимы для формирования функционально-активной конформации протеиназ. Исследование влияния ионов двухвалентных металлов на активность глутамилэндопептидазы показало, что активность раннего белка увеличивается в среднем на 20% в присутствии ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} (рисунок 10). Поздний фермент оказался более чувствительным к воздействию ионов металлов. Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} в концентрации до 20 мМ приводили к возрастанию активности фермента в 2-2,5 раза. Ионы Mn^{2+} и Co^{2+} в концентрациях 2,5-10 мМ увеличивали активность поздней протеиназы в среднем на 40-50%. По-видимому, на разных стадиях роста происходят изменения в конформационной структуре молекулы, природу которых мы соотносим с формированием элементов вторичной структуры.

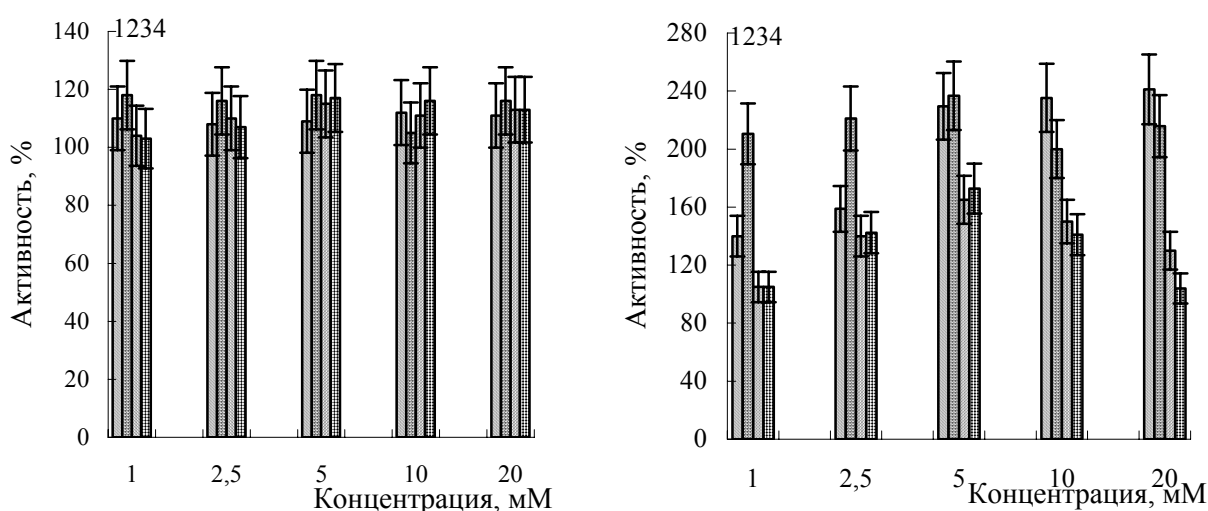


Рисунок 10 – Влияние ионов двухвалентных металлов на активность ранней и поздней глутамилэндопептидазы *B. intermedius* рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

А – ранняя протеиназа; Б – поздняя протеиназа;

1 – ионы Ca^{2+} ; 2 – ионы Mg^{2+} ; 3 – ионы Mn^{2+} ; 4 – ионы Co^{2+}

За 100% принята активность препарата глутамилэндопептидазы в отсутствие ионов металлов

Нуклеотидная последовательность гена глутамилэндопептидазы *B. intermedius* [Rebrikov et al., 1999] и рентгено-структурный анализ белка [Meijers et al., 2004] указывают на присутствие дисульфидной связи в белковой глобуле глутамилэндопептидазы. Мы предположили, что обнаруженные нами конформационные изменения могут соответствовать статусу дисульфидной связи в структуре фермента.

Исследовали влияние дитиозэритрита (ДТЭ), реагента для восстановления дисульфидных связей на активность глутамилэндопептидазы *B. intermedius* разных фаз роста (рисунок 11). В присутствии ДТЭ в концентрациях от 1 до 100 мМ активность раннего фермента падала на 50-60%. Эти данные свидетельствуют о наличии дисульфидной связи в конформационной структуре глутамилэндопептидазы.

Активность позднего фермента в присутствии тех же концентраций ДТЭ оставалась без изменения. Полученные данные указывают на восстановленное состояние дисульфидной связи в структуре поздней глутамилэндопептидазы.

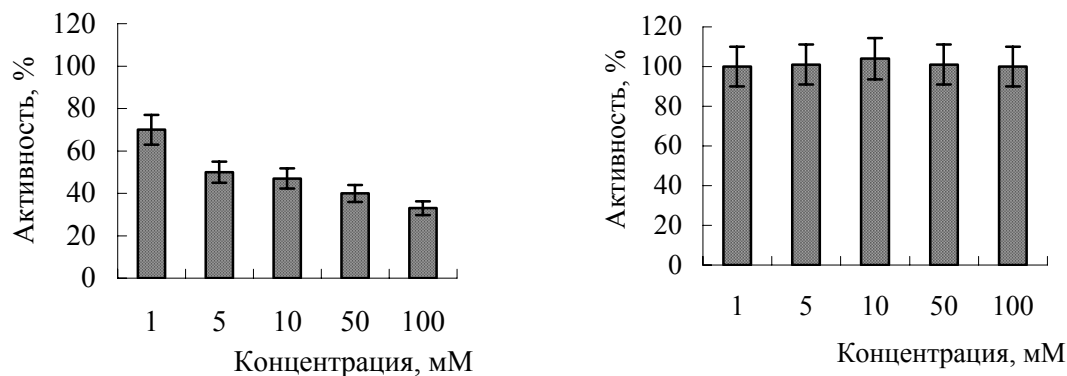


Рисунок 11 – Влияние дитиозэритрита на активность препаратов глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, соответствующих разным фазам роста рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

**А – протеиназа фазы замедления роста, Б – протеиназа стационарной фазы роста;
За 100% принята активность в отсутствие ДТЭ**

Исследовали активность ранней и поздней глутамилэндопептидазы в присутствии парахлормеркурибензоата (п-ХМБ), используемого для анализа –SH-групп в структуре белков (рисунок 12).

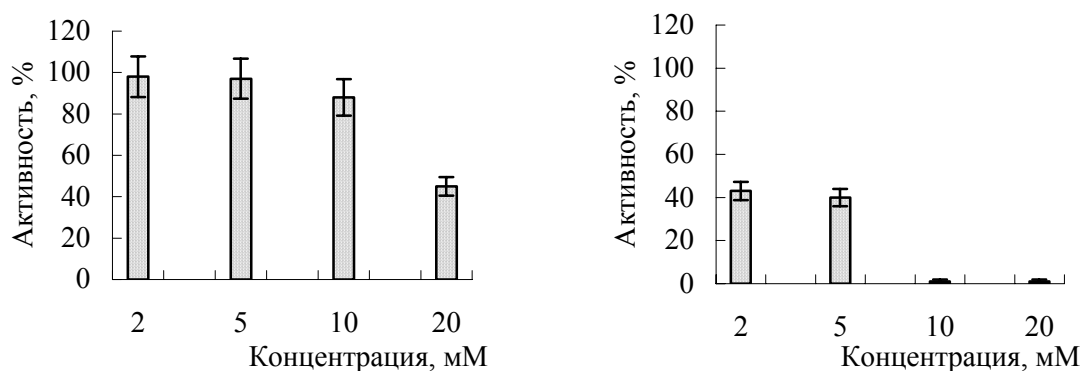


Рисунок 12 – Влияние п-ХМБ на активность препаратов глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, соответствующих разным фазам роста рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

**А – протеиназа фазы замедления роста; Б – протеиназа стационарной фазы роста;
За 100% принята активность в отсутствие п-ХМБ**

В присутствии п-ХМБ в реакционной смеси в концентрациях 2-10 мМ активность препарата раннего фермента оставалась без изменения, что свидетельствует об отсутствии свободных SH-групп в структуре фермента. Присутствие ингибитора в концентрациях 2-5 мМ снижало активность

позднего белка на 60%, а в концентрациях 10-20 мМ полностью ингибировало фермент.

Соли ртути HgNO_2 , используемые в анализе белков как реагенты на $-\text{SH}$ -группы, в концентрациях 10-20 мМ незначительно снижали активность ранней глутамилэндопептидазы (10-20%), но в концентрации 20 мМ ингибировали активность позднего белка на 80% (рисунок 13). Данные позволяют предположить наличие SH -групп структуре поздней глутамилэндопептидазы.

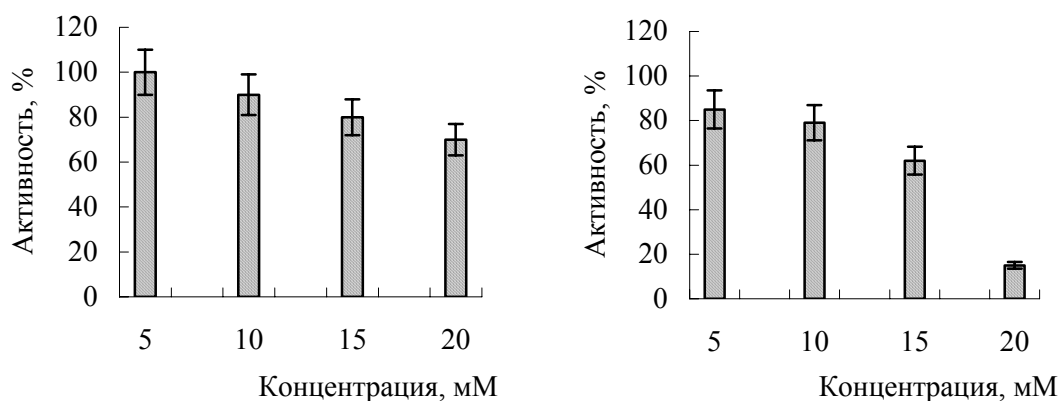


Рисунок 13 – Влияние HgNO_2 на активность препаратов глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, соответствующих разным фазам роста рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

**А – протеиназа фазы замедления роста; Б – протеиназа стационарной фазы роста;
За 100% принята активность в отсутствие HgNO_2**

Дисульфидная связь стабилизирует структуру глутамилэндопептидазы, что является важным фактором, определяющим уровень молекулярной активности раннего белка. Восстановление этой связи соответствует позднему ферменту с более низким уровнем каталитической активности. Полученные нами данные позволили предположить, что статус дисульфидной связи определяет степень молекулярной активности белка на разных стадиях роста.

При переходе к спорообразованию бактериальная клетка претерпевает несколько стадий морфогенеза, которые сопровождаются сменой белковых компонентов клеточной оболочки, среди которых фолдинговые эффекторы и шапероны, участвующие в активации секретируемых белков. Мы предполагаем, что конформационная подвижность глутамилэндопептидазы выявленная в наших исследованиях, определяется набором эффекторов, участвующих в формировании третичной структуры в соответствии со стадией роста.

Будучи ферментом с узкой субстратной специфичностью, глутамилэндопептидаза выполняет не столько трофическую, а скорее регуляторную роль. Ограниченный протеолиз является молекулярным механизмом контроля на посттрансляционном уровне, вызывая образование, инактивацию и модификацию биорегуляторов белковой и пептидной

природы. Становится очевидным, что протеиназам принадлежит первостепенная роль в реализации межклеточных взаимодействий на уровне бактериальных популяций. В качестве сигнальных молекул в этом случае могут быть пептиды – продукты расщепления протеиназ. В ходе эволюции протеолитических белков переход от ферментов катаболизма к ферментам-биорегуляторам осуществлялся за счет усложнения структуры связывающего центра, обеспечивающего специфичность и скорость гидролиза. В связи с чем, исследования глутамилспецифичных эндопептидаз, обнаруженных у бацилл, патогенных бактерий, вирусов и стрептомицетов, представляют существенный интерес во взаимосвязи с важнейшими физиологическими процессами, такими как морфогенез, адаптация, пролиферация, патогенез и дифференцировка. Нами впервые выявлена модуляция активности внеклеточной глутамилэндопептидазы на разных стадиях роста и дифференцировки бацилл. Эти данные могут служить основой для молекулярного механизма контроля уровня функциональной активности белка в зависимости от фазы развития микроорганизмов.

Таким образом, результаты сравнительного исследования свойств раннего и позднего фермента позволяют расширить наши представления о способах регуляции функциональной активности глутамилэндопептидаз, малоизученной подгруппы секретируемых сериновых протеиназ, при переходе бацилл в анабиотическое состояние.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны компоненты питательной среды, для получения высокого уровня активности ранней (24 ч роста) и поздней (48 ч роста) глутамилэндопептидазы *B. intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*.
2. Выделена и очищена глутамилэндопептидаза *B. intermedius*, соответствующая фазе замедления роста и стационарной фазе роста рекомбинантного штамма, со степенью очистки, составляющей 1257 для ранней и 1350 – для поздней протеиназы и выходом 7.8% и 12.5%, соответственно. Молекулярная масса ранней и поздней глутамилэндопептидазы составляет 23 кДа.
3. Методом масс-спектрометрии установлено, что ранняя и поздняя глутамилэндопептидаза имеет идентичную последовательность аминокислот, N- и C- концы которой совпадают.
4. Установлены различия в каталитических свойствах глутамилэндопептидазы, секретируемой в фазе замедления роста и стационарной фазе бактерий.
5. Установлено, что уровень каталитической активности глутамилэндопептидазы, соответствующей разным стадиям роста бактерий, определяется статусом дисульфидной связи в конформации белка.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Шагимарданова, Е. И. Гетерологичная экспрессия гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* штаммами *Bacillus subtilis*, дефектными по регуляторным белкам [Текст] / Е. И. Шагимарданова, И. Б. Частухина, **Т. Р. Шамсутдинов**, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, С. В. Костров, М. Р. Шарипова // Микробиология, - 2007. - Т.76. - №5. - С. 645-651.
2. Соколова, Е. А. Оптимизация выделения внеклеточных протеиназ *Bacillus intermedius* 3-19, секретируемых бактериями в поздней стационарной фазе роста [Текст] / Е. А. Соколова, **Т. Р. Шамсутдинов**, Н. П. Балабан // Ученые Записки Казанского университета. – 2007. – Т.149, Серия Естественные науки, Книга 2, №2. - С. 114-124.
3. Sharipova, M. R. The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains [Text] / M. R. Sharipova, I. B. Chastukhina, E. I. Shagimardanova, **T. R. Shamsutdinov**, N. P. Balaban, A. M. Mardanova, L. A. Gabdrakchmanova, G. N. Rudenskaya, I. V. Demiduk, S. V. Kostrov // Molecular Biology Reports. – 2007. V.34.- P. 79-87.
4. **Шамсутдинов, Т. Р.** Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, Ю. В. Данилова, Г. Н. Руденская, М. Р. Шарипова // Биоорганическая химия, - 2008. - Т.34. - №3. - С. 322-326.
5. Balaban, N. P. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* endopeptidase that is secreted in different growth phase [Text] / N. P. Balaban, A. M. Mardanova, L. A. Malikova, **T. R. Shamsutdinov**, O. N. Ilinskaya, G. N. Rudenskaya, M. R. Sharipova // Annals of Microbiology. – 2008. – V. 58 (4). -P. 1-8.
6. Маликова, Л. А. Субтилизиноподобные протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* [Текст] / Л. А. Маликова, **Т. Р. Шамсутдинов**, Г. Н. Руденская, А. М. Марданова, Н. П. Балабан // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». Казань, 2005. - С. 55-56.
7. Маликова, Л. А. Особенности контроля биосинтеза субтилизинов, секретируемых *Bacillus pumilus* КММ 62 [Текст] / Л. А. Маликова, **Т. Р. Шамсутдинов**, О. В. Соколова, А. М. Марданова. // Материалы 9-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2005. - С. 201.
8. Шагимарданова, Е. И. Молекулярные механизмы регуляции экспрессии гена глутамилэндопептидазы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* [Текст] / Е. И. Шагимарданова, **Т. Р. Шамсутдинов**, И. Б. Частухина, М. Р. Шарипова // Материалы V Республиканской научно-

практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука, инновации, бизнес», Казань, 2005. - С. 60-61.

9. **Шамсутдинов, Т. Р.** Оптимизация среды для биосинтеза глутамилэндопептидазы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, Е. И. Шагимарданова, Л. А. Маликова, Н. П. Балабан, М. Р. Шарипова // Материалы V Республиканской научно- практической конференции молодых ученых и специалистов «Наука, инновации, бизнес», Казань, 2005. С. 53-54.
10. **Шамсутдинов, Т. Р.** Оптимизация среды для биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73 [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, Е. И. Шагимарданова, Л. А. Маликова, Н. П. Балабан // Материалы Молодежной школы конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 2005. - С. 111-113.
11. Шагимарданова, Е. И. Регуляция синтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными клетками *Bacillus subtilis* в стационарной фазе роста [Текст]/ Е. И. Шагимарданова, **Т. Р. Шамсутдинов**, И. Б. Частухина // Материалы XLIII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», Новосибирск, 2005. - С. 92-93.
12. Shagimardanova, E. I Analysis of regulatory region of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene [Text] / E. I. Shagimardanova, **T. R. Shamsutdinov**, I. B. Chastuchina, M. R. Sharipova // BGRS-2006: Proceedings of the fifth international conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Novosibirsk, Russia, 2006. - P. 156-160.
13. **Шамсутдинов, Т. Р.** Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *B. intermedius* в клетках *B. subtilis* [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, А. Р. Каюмов, Р. А. Байрамов, М. Р. Шарипова // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006», Москва, 2006. - С. 248.
14. **Шамсутдинов, Т. Р.** Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *B. intermedius* в клетках *B. subtilis* [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, А. Р. Каюмов, Р. А. Байрамов, М. Р. Шарипова // Биология – наука XXI века: Сборник тезисов / 10-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 2006. - С. 60.
15. **Шамсутдинов, Т. Р.** Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *B. intermedius* в клетках *B. subtilis* [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, А. Р. Каюмов, А. Р. Сабирова, М. Р. Шарипова // «Материалы и технологии XXI века»: тезисы докладов / VI Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета, Казань, 2006. – С. 125

16. **Шамсутдинов, Т. Р.** Экспрессия генов сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* в клетках *Bacillus subtilis*, дефектных по NRGB-регуляторному белку [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, А. Р. Каюмов, М. Р. Шарипова // Материалы VI симпозиума «Химия протеолитических ферментов», Москва, 2007. - С. 62.
17. Шагимарданова, Е. И. Гетерологичная экспрессия гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* [Текст] / Е. И. Шагимарданова, И. Б. Частухина, **Т. Р. Шамсутдинов**, М. Р. Шарипова // Материалы VI симпозиума «Химия протеолитических ферментов», Москва, 2007. - С. 63.
18. **Шамсутдинов, Т. Р.** Свойства глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, продуцируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста [Текст] / Т. Р. Шамсутдинов, А. А. Тойменцева, Ю. В. Данилова, А. М. Черемин, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, М. Р. Шарипова // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 2008.- С. 381.
19. Данилова, Ю. В. Характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой на разных фазах роста рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* [Текст] / Ю. В. Данилова, А. М. Черемин, **Т. Р. Шамсутдинов** // Материалы XLVI международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, 2008. - С. 35.
20. Каюмов, А. Р. Экспрессия генов сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* в клетках *Bacillus subtilis* в условиях азотного голодания [Текст] / А. Р. Каюмов, **Т. Р. Шамсутдинов**, А. Р. Сабирова, К. П. Федорова, А. И. Ахметова, М. Р. Шарипова // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 2008. - С. 148.
21. Шарипова, М. Р. Вклад сигнальной трансдукции в формирование клеточного ответа в стационарной фазе бацилл [Текст] / М. Р. Шарипова, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, А. Р. Каюмов, **Т. Р. Шамсутдинов**, Е. О. Михайлова, А. Р. Сабирова, А. А. Тойменцева, Н. Л. Рудакова [Текст] // Материалы докладов Съезда с международным участием «IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов», Новосибирск, 2008. - С. 109.